

## 紫外線照射によるマダイの雌性発生誘起

荒川 敏久・宮原 治郎

Induction of Gynogenesis with Ultraviolet Rays  
in Red Sea Bream, *Pagrus major*

Toshihisa ARAKAWA and Jiro MIYAHARA

UV irradiation methods for inducing gynogenesis in red sea bream are described. Milt of black sea bream was diluted with Ringer solution for *Pleuronectes platessa* in a volume ratio of 1 : 50, and irradiated with a sterilizing lamp at intensities of 0 to 4,000 erg/mm<sup>2</sup>. Eggs of red sea bream were inseminated with the irradiated milt, and subjected to cold treatment. The eggs, inseminated with milt irradiated at 1,500 erg/mm<sup>2</sup> and subjected to cold treatment (treated fish), grew up to 100 mm TL in 150 days. Erythrocyte size and morphology of treated fish were compared with those of diploid, triploid and crossbred (red sea bream with black sea bream) to confirm gynogenesis induction.

High hatching rates (more than 30%) were found at the intensities ranging from 100 to 1,500 erg/mm<sup>2</sup>. Hatching rate of the treated fish (40%) was lower than control fish (not subjected to irradiation nor cold treatment, 60%). Survival rate was lower for the treated fish (35%) than for control fish (57%) during larval growth of up to 18mm, but it then became almost equal and higher (more than 90%) for both groups. The major axis of erythrocyte of the treated fish was of the similar length to that of diploid red sea bream and shorter than that of triploid red sea bream. Morphology of the treated fish was similar to control fish and different from crossbred. We concluded that our treatment successfully induced gynogenesis.

雌性発生は、品種改良に必要な時間を短縮するうえで有効な手法<sup>1)</sup>とされ、淡水魚<sup>2-4)</sup>や異体類<sup>5, 6)</sup>では多くの報告がある。しかしながら、海産養殖の主要魚種であるブリやマダイについてはほとんど研究がなされていない。

そこで、筆者らはマダイ *Pagrus major* について紫外線照射による雌性発生の誘起方法について検討を行い、その誘導を確認したので報告する。

### 材料と方法

**精液希釈液の検討** タイ類では有効な精液希釈液が開発されていないため、淡水魚<sup>3)</sup>や異体類<sup>5, 6)</sup>で用いられている硬骨魚用リングル（一部改変）の使用可能性を検討した。

検討した希釈精液の組成を表1に示した。供試した精液は、雌性発生の確認を容易にするため、

表1 精液希釈液の組成 (g/l)

Table 1. Composition of diluents for milt (g/l)

|                                       | I*   | II   | III | IV  | V   | VI  | VII | VIII |
|---------------------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| NaCl                                  | 8.22 | 9.35 | 7.5 | 7.5 | 7.5 | 5.0 | 7.5 | 7.5  |
| KCl                                   | 0.39 | 0.30 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.4  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0.72 | 0.59 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.2  |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O  | 0.23 |      |     |     |     |     |     |      |
| NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.28 |      |     |     |     |     |     |      |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 0.20 |      |     |     |     |     |     |      |
| Glucose                               | 1.00 |      |     |     |     |     |     |      |

\* : Ringer solution for *Pleuronectes platessa*, Cobb et al. (1973)……quote from a paper by Midsukami (1979).

クロダイのものをを用いた。精液は乾いた注射筒に体液が混じらないように採取した後、15ml スチロール瓶に0.2ml ずつ分注し、各々の希釈液で50倍に希釈した。希釈精液は密封した後3~4℃の冷蔵庫中に保存した。各希釈液の有効性は、希釈直後と保存1・2・4・24時間後に少量の希釈精液を海水と接触させ、運動を開始した精子の割合を顕微鏡下で観察して判定した。

**精液の紫外線照射条件の検討** 適正紫外線照射量は以下の方法で処理したマダイ卵のふ化率の推移から求めた。

クロダイの精液は、*Pleuronectes platessa* のリングル<sup>7)</sup>で50倍に希釈した後、その5ml を9cm シャーレに容れ、振とうしながら東芝製紫外線蛍光灯GL-15を用いて0~4,000erg/mm<sup>2</sup>の間の7段階で紫外線を照射し、搾出法で得たマダイ卵に媒精した。マダイ媒精卵は、低温処理(媒精3分後15分間<sup>8)</sup>)による染色体の倍数化を行った後、浮上卵300粒を100ml ビーカーに収容し、ふ化率を求めた。

**仔稚魚の飼育** 紫外線照射精液で媒精し低温処理を施したマダイ卵(以下処理マダイと称す)をふ化後稚魚まで飼育し、その成長と生残を同時に作出した無処理マダイ、3倍体マダイおよびマダイ(雌)×クロダイ(雄)の交雑魚と比較した。な

お、精液の紫外線照射強度は1,500erg/mm<sup>2</sup>とした。

仔稚魚の飼育には1m<sup>2</sup>ポリカーボネイト水槽を用い、浮上卵を各々20,000~40,000粒収容した。餌料には海産クロレラと油脂酵母で栄養強化したシオミズツボワムシ、乳化油脂(エステル85)で油脂強化したアルテミア(天津産)のノウブリウスおよび微粒子飼料を用いた。試験飼育期間は36日間としたが、これらの魚はその後も海面網生簀中で飼育を継続し、平均全長が10cmを越えた時点で、雌性発生誘導の判定に供した。

**雌性発生誘導の判定** 雌性発生の誘導には精子染色体の破壊と受精卵の極体放出阻止の両方に成功する必要がある。そのどちらか、または両方に失敗すると半数体や異種3倍体または交雑魚が作出される。3倍体については赤血球長径の比較<sup>9)</sup>により、交雑魚については外部形態の比較により判定が可能である。また、半数体魚はふ化後数日で死滅し、現象としては処理魚の生残率の低下として現れるに過ぎないので、ここでは、全長約10cmに成長した処理魚の赤血球長径と外部形態を無処理魚や3倍体魚、または交雑魚と比較することにより雌性発生の誘導を判定した。

赤血球長径は尾部から採血した血液の塗抹標本<sup>9)</sup>を用いて測定した。

外部形態の測定は全長・尾叉長・体長・体高・体幅・頭長・胸鰭長・吻長・上顎長・眼窩径・両眼間隔・眼下幅・背鰭第4棘長・尻鰭第2,3棘長・吻角度の16形質について行った(図1)。これらの形質の測定は原則として松原<sup>10)</sup>に準じたが、全長は尾鰭を平常に開いた状態で測定した。このうち、全長・尾叉長・体高・体幅・頭長・胸鰭長については体長に対する、その他の形質については頭長に対する直線回帰式を求め、これら回帰式の共分散分析により外部形態の比較を行った。また、吻角度については $t$ 検定により比較を行った。

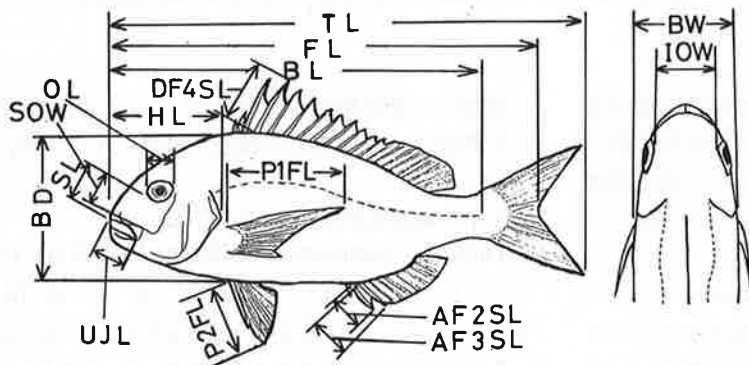


図1 測定部位

Fig. 1. Body parts measured in the present study.

TL: Total length, FL: Fork length, BL: Body length, BD: Body depth, BW: Body width, HL: Head length, P1FL: Pectoral fin length, SL: Snout length, UJL: Upper jaw length, OL: Orbit length, IOW: Interorbital width, SOW: Suborbital width, DF4SL: Dorsal fin 4th spine length, AF2SL: Anal fin 2nd spine length, AF3SL: Anal fin 3rd spine length, P2FL: Pelvic fin length

結果と考察

**精液希釈液の検討** 精子の運動は保存中にはいづれの希釈液中でも認められなかった。しかしながら、保存後に海水と接触させたときの精子の運動性には差がみられ、I, II, IV, Vの希釈液中では24時間後にも精子は活発に活動したが、その他の希釈液中ではそれより短い保存時間で活動が低下した(表2)。このことから、これらの4種がクロダイ精液の希釈液として使用可能と判定されたが、後述の試験ではこの内から異体類で最もよく使用されているI (*Pleuronectes* のリングル<sup>7)</sup>)を使用した。

**精液の紫外線照射条件の検討** マダイ卵のふ化率の推移は図2に示したようになり、マダイ精液で媒精した卵は94.3%と高いふ化率を示したが、クロダイ精液の媒精では27.8%に、クロダイ精液で媒精後低温処理を施した場合には35.4%にふ化率は低下した。また、紫外線を照射したクロダイ精液で媒精し低温処理を施した卵は、紫外線照射量が100から1,000 $\text{erg}/\text{mm}^2$ までは照射量の増加と共にふ化率も32.0から56.8%に上昇したが、1,500 $\text{erg}/\text{mm}^2$ では36.8%に、2,000 $\text{erg}/\text{mm}^2$ 以上では約25%に低下した。

そこで今回の試験では30%以上のふ化率を示した紫外線照射量の最高値の1,500 $\text{erg}/\text{mm}^2$ を雌性発生誘起線量として採用した。

表2 希釈液中における保存時間とクロダイ精子の運動性の関係

Table 2. Relationship between sperm activity and storage time in diluents

| Diluents | storage time (hr.) |     |     |     |     |
|----------|--------------------|-----|-----|-----|-----|
|          | 0                  | 1   | 2   | 4   | 24  |
| I        | S++                | S++ | S++ | S++ | S++ |
| II       | S++                | S++ | S++ | S++ | S++ |
| III      | S++                | S++ | S++ | S++ | S+  |
| IV       | S++                | S++ | S++ | S++ | S++ |
| V        | S++                | S++ | S++ | S++ | S++ |
| VI       | S++                | S+  | S+  | S+  | S±  |
| VII      | S++                | S++ | S++ | S+  | S±  |
| VIII     | S++                | S+  | S+  | S+  | S+  |

S : Sperm inactive before contact with sea water.  
 ++ : More than 80% sperm active after contact with sea water, + : 20-80%, ± : 0-20%, - : 0%.

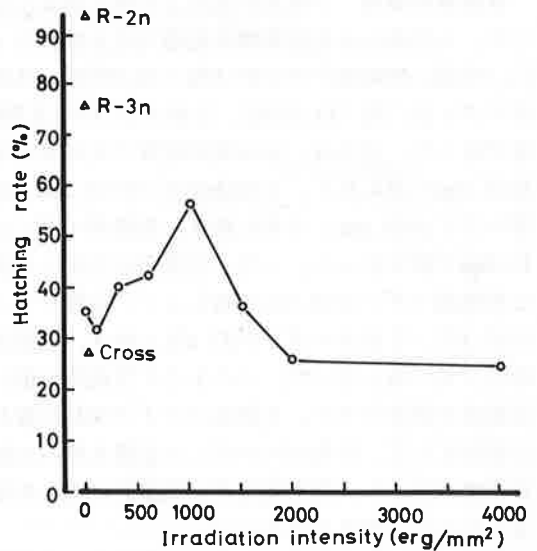


図2 紫外線照射精液で媒精したマダイ卵のふ化率

Fig. 2. Hatching rates of red sea bream eggs inseminated with irradiated milt. R-2n : Diploid red sea bream. R-3n : Triploid red sea bream. Cross : Crossbred (Red sea bream with Black sea bream).

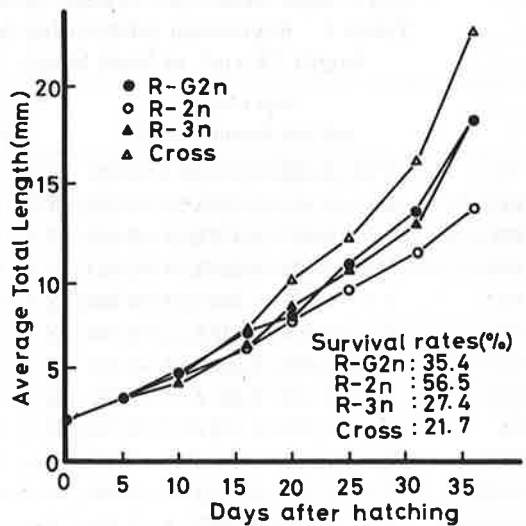


図3 仔稚魚の成長と生残の比較

Fig. 3. Comparison of growth and survival rates among gynogenetic diploid (R-G2n), diploid (R-2n) and triploid (R-3n) red sea bream and crossbred (Cross).

**仔稚魚の飼育** 仔稚魚の成長と生残を図3に示した。ふ化率とふ化仔魚数は処理マダイ39.7%・14,700尾, 無処理マダイ60.0%・14,700尾, 3倍体マダイ35.7%・13,000尾, 交雑魚15.3%・3,500尾であった。成長は, 36日間の飼育で交雑魚が全長23.2mmと最も良く, 3倍体マダイが18.5mm, 処理マダイが18.4mmとそれに続き, 無処理マダイは13.6mmで最も劣った。一方, 生残率は成長とは逆に無処理マダイが56.5%で最もよく, 処理マダイが35.4%, 3倍体マダイが27.4%と続き, 交雑魚は21.7%で最も劣った。このように生残率が低い交雑魚や処理マダイ, 3倍体マダイで成長が優れた原因として, 仔魚がへい死した結果水槽内の飼育密度が低下し, 低密度飼育が間接的に成長を促進したことが考えられた。

**雌性発生誘導の判定** マダイ2倍体魚と3倍体魚の赤血球長径の平均と分布を図4に示した。2倍体マダイの150個の平均赤血球長径は10.9 $\mu$ m (9~13 $\mu$ m), これに対し3倍体マダイは13.4 $\mu$ m (11~15 $\mu$ m)であり, 明らかな差が認められた。一方, 処理マダイ30尾の平均赤血球長径(各20

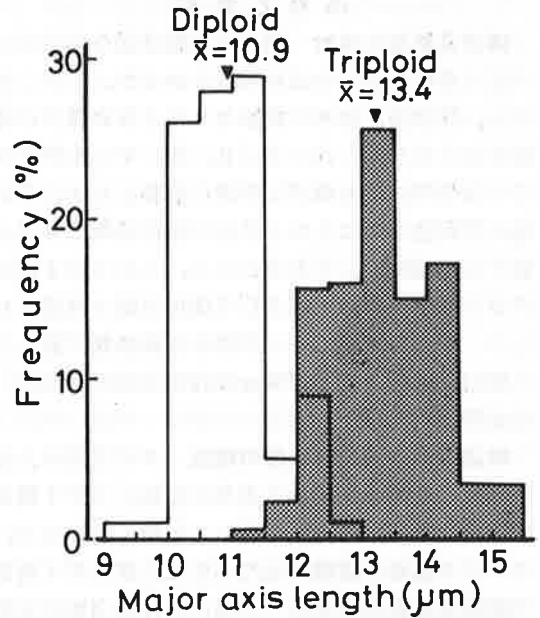


図4 マダイ2倍体魚と3倍体魚の赤血球長径の比較

Fig. 4. Comparison of major axis length of erythrocyte between diploid and triploid red sea bream.

表3 体長 (Xcm) または頭長 (Zcm) に対する各形質 (Ycm) の回帰式  
Table 3. Regression relationship between each character (Y cm) and body length (X cm) or head length (Z cm)

|       | Non treated<br>red sea bream (n=30) | Treated<br>red sea bream (n=30) | Crossbred<br>(n=30)            |
|-------|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| TL    | Y = 0.155 + 1.217X (r = 0.99)       | Y = 0.062 + 1.220X (r = 0.99)   | Y = 0.815 + 1.166X (r = 0.99)  |
| FL    | Y = 0.263 + 1.126X (r = 0.99)       | Y = 0.244 + 1.121X (r = 1.00)   | Y = 0.410 + 1.120X (r = 0.99)  |
| BD    | Y = -0.327 + 0.473X (r = 0.93)      | Y = 0.246 + 0.416X (r = 0.94)   | Y = 0.019 + 0.455X (r = 0.98)  |
| BW    | Y = -0.420 + 0.230X (r = 0.91)      | Y = -0.316 + 0.205X (r = 0.90)  | Y = -0.637 + 0.233X (r = 0.95) |
| HL    | Y = 0.699 + 0.248X (r = 0.95)       | Y = 0.731 + 0.249X (r = 0.91)   | Y = 0.630 + 0.269X (r = 0.99)  |
| PIFL  | Y = -0.006 + 0.248X (r = 0.76)      | Y = 0.172 + 0.221X (r = 0.81)   | Y = 0.704 + 0.228X (r = 0.93)  |
| SL    | Y = -0.385 + 0.504Z (r = 0.93)      | Y = -0.344 + 0.486Z (r = 0.90)  | Y = -0.082 + 0.385Z (r = 0.97) |
| UJL   | Y = -0.146 + 0.387Z (r = 0.88)      | Y = 0.041 + 0.316Z (r = 0.94)   | Y = -0.015 + 0.346Z (r = 0.97) |
| OL    | Y = 0.404 + 0.178Z (r = 0.75)       | Y = 0.422 + 0.162Z (r = 0.71)   | Y = 0.472 + 0.120Z (r = 0.86)  |
| IOW   | Y = 0.041 + 0.341Z (r = 0.83)       | Y = 0.079 + 0.329Z (r = 0.80)   | Y = 0.051 + 0.316Z (r = 0.95)  |
| SOW   | Y = -0.263 + 0.282Z (r = 0.86)      | Y = -0.245 + 0.281Z (r = 0.87)  | Y = -0.222 + 0.253Z (r = 0.97) |
| DF4SL | Y = 0.199 + 0.290Z (r = 0.60)       | Y = -0.480 + 0.511Z (r = 0.68)  | Y = 0.091 + 0.365Z (r = 0.87)  |
| AF2SL | Y = -0.209 + 0.366Z (r = 0.71)      | Y = 0.238 + 0.202Z (r = 0.52)   | Y = 0.133 + 0.332Z (r = 0.78)  |
| AF3SL | Y = -0.070 + 0.283Z (r = 0.68)      | Y = 0.360 + 0.122Z (r = 0.35)   | Y = 0.251 + 0.214Z (r = 0.71)  |
| P2FL  | Y = -0.533 + 0.781Z (r = 0.81)      | Y = 0.055 + 0.573Z (r = 0.85)   | Y = -0.135 + 0.669Z (r = 0.94) |

n : Number of fish measured. r : Coefficient of correlation. For abbreviations, see Fig. 1.

表4 体長または頭長に対する各形質の直線回帰式の検定（共分散分析）  
 Table 4. Comparison of each character on fork length or head length between treated and non-treated red sea bream and between treated red sea bream and crossbred by means of covariance analysis

| Characters | Treated VS Non-treated |               |               | Treated VS Crossbred |           |    |
|------------|------------------------|---------------|---------------|----------------------|-----------|----|
|            | red sea bream          | red sea bream | red sea bream | red sea bream        | Crossbred |    |
|            | Fv                     | Fb            | Fa            | Fv                   | Fb        | Fa |
| TL*        | —                      | —             | ○             | —                    | —         | ◎  |
| FL*        | —                      | —             | ○             | —                    | —         | ◎  |
| BD*        | —                      | —             | —             | —                    | —         | ◎  |
| BW*        | —                      | —             | ◎             | —                    | —         | —  |
| HL*        | ○                      | —             | ○             | —                    | —         | —  |
| PIFL*      | —                      | —             | —             | —                    | —         | ◎  |
| SL**       | —                      | —             | —             | —                    | —         | ◎  |
| UJL**      | —                      | —             | ○             | —                    | —         | ◎  |
| OL**       | —                      | —             | ◎             | —                    | ○         | ◎  |
| IOW**      | —                      | —             | —             | —                    | —         | ◎  |
| SOW**      | —                      | —             | —             | —                    | —         | ◎  |
| DF4SL**    | ◎                      | —             | —             | —                    | —         | ◎  |
| AF2SL**    | —                      | —             | —             | —                    | —         | ◎  |
| AF3SL**    | —                      | —             | ○             | —                    | —         | ◎  |
| P2FL**     | —                      | —             | —             | —                    | —         | ◎  |

\*: Characters on fork length, \*\*: Characters on head length. Fv, Fb and Fa are the variance ratios to test the significance of the differences of residual variance, regression coefficient and adjusted mean, respectively.

—: Not significant at 5% level, ○: Significant at 5% level, ◎: Significant at 1% level. For abbreviations, see Fig. 1.

個)は10.2~11.1μmであり、すべてが2倍体であると判定された。

各形質の直線回帰式を表3に示した。これら回帰式は処理マダイの尻鰭第3棘長の相関係数が0.35と低い以外はいずれも高い相関を示した。

回帰直線の共分散分析の結果を表4に示した。処理マダイと無処理マダイの間には体幅・眼窩径・背鰭第4棘長においてのみ1%の危険率で有意差が認められたが、処理マダイと交雑魚の間には体幅・頭長以外の13の形質において1%の危険率で有意差が認められた。また、表5に示したように処理マダイの背鰭条数は大部分がXII, 10で無処理マダイと等しく交雑魚とは異なっており、吻角度も無処理マダイとは差がなく交雑魚とは1%の危険率で有意差が認められた。

以上のように、処理マダイは外部形態が無処理

表5 背鰭条数と吻角度の比較

Table 5. Comparison of numbers of dorsal fin rays and snout angle among treated and non-treated red sea bream and crossbred

|                 | Non-treated red sea bream | Treated red sea bream | Crossbred   |
|-----------------|---------------------------|-----------------------|-------------|
| Dorsal fin rays | (%)                       | (%)                   | (%)         |
| X I, 10         | 3.3                       |                       |             |
| X I, 11         | 3.3                       | 6.7                   | 66.7        |
| X II, 9         | 6.7                       | 3.3                   |             |
| X II, 10        | 86.8                      | 90.0                  | 33.3        |
| snout angle     |                           |                       |             |
|                 | 81.7±1.90                 | — 80.9±2.50           | ◎ 76.9±1.93 |

n=30, —: Not significant at 5% level, ◎: Significant at 1% level

マダイにはほぼ等しく交雑魚とは大きく異なり、また前述したようにすべてが2倍体であることから、雌性発生2倍体として誘導されていると判定された。

以上のことから、本試験の条件でマダイの雌性発生2倍体が誘導されたことが明らかになった。しかしながら、今回の雌性発生魚(処理マダイ)の生産率(ふ化率×生残率×誘導率=14.1%)は無処理魚(33.9%)の約40%と低く、今後処理条件の改善による生産性の向上が必要と考えられる。最後に、本研究を実施するに当たり採卵や仔稚魚の飼育にご協力を頂いた東京水産大学学生佐藤洋二氏に感謝の意を表す。

### 要 約

紫外線照射によるマダイ雌性発生の誘導方法について検討し、以下の結果を得た。

- 1) クロダイ精液の希釈液には *Pleuronectes platessa* のリングルが使用可能であった。
- 2) 9cmシャーレに50倍希釈精液を5ml容れた場合には、100~1,500erg/mm<sup>2</sup>の紫外線照射でマダイ媒精卵は30%以上の比較的高いふ化率を示した。
- 3) 1,500erg/mm<sup>2</sup>の紫外線を照射したクロダイ精液で媒精し、媒精3分後から15分間低温処理を施したマダイ卵は雌性発生2倍体として誘導された。
- 4) 上記の方法で誘導したマダイ雌性発生魚の生産率は卵から14.1%で、無処理マダイ(33.9%)の約40%であった。

### 文 献

- 1) 小野里坦：魚類の雌性発生，水産育種，(6)，11—18，(1981)。
- 2) 小野里坦・山羽悦郎：紫外線照射によるサケ目魚類4種の雌性発生誘起，日水誌，49，693—699，(1983)。
- 3) 富田政勝：ニシキゴイの遺伝に関する研究—III，雌性発生誘起実験，新潟県内水面水産試験場調査研究報告，(12)，45—50，(1985)。
- 4) N. Taniguchi, A. Kijima, J. Fukai, and Y. Inada : Conditions to induce triploid and gynogenetic diploid in Ayu *Plecoglossus altivelis*, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52, 49—54, (1986)。

- 5) 田畑和男・五利江重昭・中村一彦：紫外線照射によるヒラメの雌性発生2倍体の誘起条件，日水誌，52，1901—1904，(1986)。
- 6) 田畑和男・中村一彦・五利江重昭：マコガレイの雌性発生誘起，兵庫水試研報，(23)，43—47，(1985)。
- 7) 水上稔：生理的塩類溶液—その処方と作り方—，啓学出版，東京，1979，pp239—240。
- 8) 荒川敏久・高屋雅生・井上潔・高見生雄・山下金義：低温処理法によるマダイおよびクロダイの3倍体誘導条件の検討，長崎水試研報，(13)，25—30，(1987)。
- 9) 田中克己・浜清：顕微鏡標本の作り方，第17版，裳華房，東京，1977，pp248—250。
- 10) 松原喜代松：魚類の形態と検索，第二版，石崎書店，東京，1972，pp394—416。
- 11) G. W. Snedecor and W. G. Cochran：統計的方法(畑村又好・奥野忠一・津村善郎訳)，原書第6版，岩波書店，東京，1972，pp394—416。